

乙型肝炎病毒感染人胎盘绒毛膜癌 BeWo 细胞体外培养模型的建立

丁 洋, 白 菡, 盛秋菊, 马 力, 窦晓光

(中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110004)

[摘 要] **目的** 建立乙型肝炎病毒(HBV)感染人绒毛膜癌滋养层细胞(BeWo)体外培养模型,探讨 HBV 宫内感染机制。**方法** 应用高病毒载量的 HBV 阳性血清感染 BeWo 细胞并传代,应用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测感染初代细胞和传代细胞内以及上清液中 HBV DNA 量;应用化学发光微粒子免疫法检测感染后初代细胞和传代细胞的上清液中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)量;应用 SABC 免疫组化检测感染细胞内 HBsAg、乙型肝炎核心抗原(HBcAg)的表达。**结果** 感染初代各时间点细胞内和上清液中 HBV DNA 量随时间延长而增加,120 h HBV DNA 量最高;传代细胞内和上清液中 HBV DNA 量随传代次数增加逐渐降低,5 代后检测均为阴性。感染初代各时间点细胞的上清液中 HBsAg 量随时间延长而增加;传代细胞的上清液中 HBsAg 量在 1~3 代为阳性,但量逐渐降低,4 代后均为阴性。感染初代各时间点细胞和传代细胞的上清液中 HBeAg 量均为阴性;1~3 代细胞 HBsAg、HBcAg 染色可见阳性细胞。**结论** HBV 可以感染 BeWo 细胞,且能在传代细胞中表达;BeWo 细胞可用于 HBV 宫内感染机制的研究。

[关 键 词] 肝炎病毒,乙型;滋养层细胞;BeWo 细胞;宫内感染;母婴传播

[中图分类号] R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)01-0012-05

In vitro culture model of hepatitis B virus-infected human choriocarcinoma BeWo cells

DING Yang, BAI Han, SHENG Qiu-ju, MA Li, DOU Xiao-guang (Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] **Objective** To establish the *in vitro* culture model of hepatitis B virus-infected human choriocarcinoma BeWo cells, and evaluate the mechanism of HBV intrauterine infection. **Methods** BeWo cells were infected with the serum containing high level of HBV, HBV DNA load in the intracellular and supernatant were detected by real-time PCR; supernatant HBsAg and HBeAg quantitative assay was performed by chemiluminescent microparticle immunoassay; expression of HBsAg and HBcAg in the infected cells was detected with SABC immunohistochemistry. **Results** In the first passage of infected BeWo cells, the intracellular and supernatant HBV DNA load increased with time, and reached peak 120 hours after infection; In the subsequent passages, the intracellular and supernatant HBV DNA load decreased gradually and became negative after the fifth passage. The supernatant HBsAg quantity in the first passage increased with time, in the first-third passages were all tested as positive, but decreased gradually, all were negative after the fourth passage. The supernatant HBeAg quantity was negative in primary and subsequent passages; The dyed HBsAg and HBcAg in the first-third passage cells showed positive. **Conclusion** HBV can infect BeWo cells and express in subsequent passages, BeWo cells can be used to study the mechanism of HBV intrauterine infection.

[Key words] hepatitis B virus; trophoblast cell; BeWo cell; intrauterine infection; mother-to-infant transmission

[Chin Infect Control, 2012, 11(1): 12-16]

宫内感染是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)母婴传播的重要途径之一^[1]。研究宫内感染

[收稿日期] 2011-07-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30972612)

[作者简介] 丁洋(1976-),女(汉族),辽宁省沈阳市人,副教授,主要从事乙型肝炎病毒母婴传播及阻断研究。

[通讯作者] 窦晓光 E-mail: douxg@sj-hospital.org

的机制对于阻断 HBV 的母婴传播至关重要。我们通过感染人绒毛膜癌滋养层细胞 BeWo 细胞株,建立 HBV 体外感染胎盘滋养层细胞模型,研究 HBV 体外感染状况,为探讨 HBV 宫内感染机制提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胎盘滋养层细胞来源的 BeWo 细胞株和 F-12K 培养基,购自美国模式培养物集存库(ATCC);胎牛血清(GIBCO 美国);胰蛋白酶(SIGMA 美国)。细胞基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号:17320);HBV DNA 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测试剂(深圳凯杰生物工程有限公司,批号:20100901/9);乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)定量化学发光微粒子免疫检测试剂(雅培,美国;批号分别为 01487LFL00、96376HN01);即用型 SABC 免疫组化染色试剂(武汉博士德生物工程有限公司,批号:201011)。

1.2 方法

1.2.1 BeWo 细胞培养 F-12K 培养液(含 10%胎牛血清及 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素;pH 7.4),置 5%CO₂、饱和湿度、37℃孵育箱培养。细胞密度达 90%以上,0.25%胰酶消化传代。

1.2.2 HBV 感染 BeWo 细胞 细胞传代后密度达 70%~80%时弃培养液,换无血清 F-12K 培养液,按 100 DNA/cell 浓度加入无菌 HBV 阳性血清,轻混培养液,使其均匀铺于细胞面上,37℃孵育 24 h。收取感染后的培养液,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗涤感染过的细胞面后弃去洗液,收取第 8 次洗涤液(HBsAg 检测为阴性),加入含 10%胎牛血清的培养液继续培养,收集 24、48、72、96、120 h 细胞和上清液。传代并收集各代细胞、上清液及细胞爬片

(0.01 mol/L PBS 洗涤,4%多聚甲醛固定,-80℃冻存),共收集 10 代。

1.2.3 BeWo 细胞 DNA 提取 感染初代各时间点细胞和传代细胞 DNA 提取,按照细胞基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。

1.2.4 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测 感染初代各时间点细胞和上清液及传代细胞和上清液(相同时间点)做 HBV DNA 定量检测,按照 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书操作;以 HBV DNA 质粒为模板制作标准曲线。反应体积 40 μL,40 个循环;记录 CT 值,通过标准曲线计算出 HBV DNA 量。

1.2.5 HBsAg、HBeAg 定量化学发光微粒子免疫检测 感染初代各时间点细胞的上清液及传代细胞的上清液,做 HBsAg、HBeAg 定量检测,按照 HBsAg、HBeAg 定量化学发光微粒子免疫检测试剂盒说明书操作;以未感染细胞培养液作空白对照。HBsAg<0.05 IU/mL 为阴性,HBeAg<1.0 s/co 为阴性;反之为阳性。

1.2.6 免疫组化检测感染后传代细胞中 HBsAg、乙型肝炎核心抗原(HBcAg)表达 传代细胞爬片检测 HBsAg 及 HBcAg 的表达,按照即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒说明书操作;以未加 HBV 感染的细胞爬片为阴性对照,以不加一抗而用 PBS 代替的细胞爬片为空白对照。

2 结果

2.1 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测

2.1.1 感染后初代细胞内及上清液中 HBV DNA 定量 HBV 感染 BeWo 细胞初代各时间点细胞内和上清液中 HBV DNA 量均随时间延长而增加。见图 1。

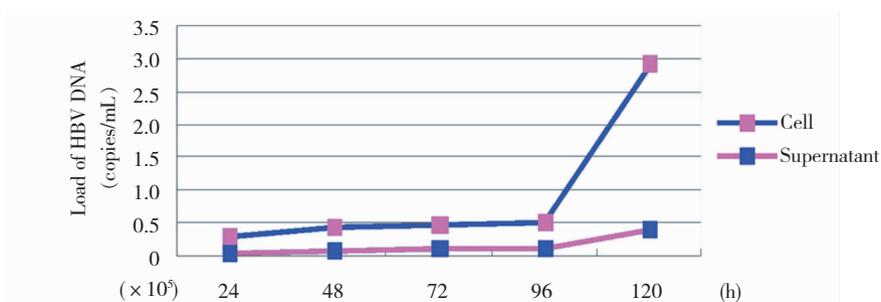


图 1 感染后初代细胞及上清液不同时间点 HBV DNA 量

Figure 1 Intracellular and supernatant HBV DNA load of the first passage of infected cells at different time points

2.1.2 感染后传代细胞内及上清液中 HBV DNA 定量 HBV 感染细胞后传代(1~10 代),各代细胞内及上清液中 HBV DNA 量均随着传代次数增加

逐渐降低,至第 5 代时消失。见图 2。

2.1.3 HBV DNA 定量扩增曲线图、标准曲线见图 3、4。

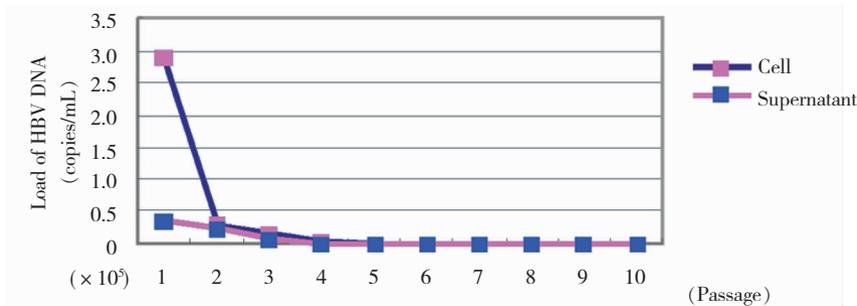


图 2 感染后各代细胞和上清液 HBV DNA 量

Figure 2 Intracellular and supernatant HBV DNA load at the first-tenth passages of infected cells

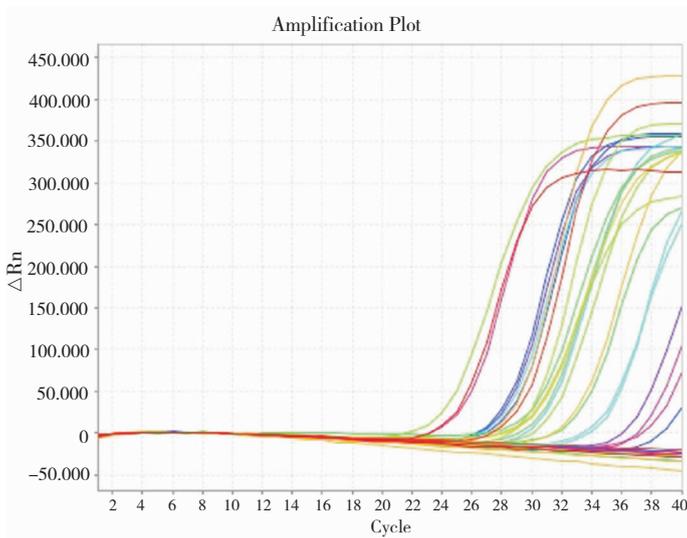


图 3 感染后各代细胞及上清液中 HBV DNA 定量扩增曲线图

Figure 3 Amplification curves of intracellular and supernatant HBV DNA load of each passage of infected cells

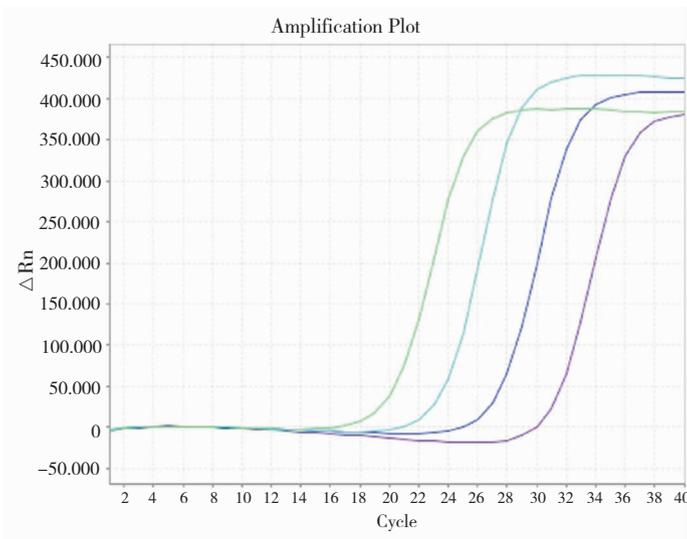


图 4 HBV DNA 定量标准曲线

Figure 4 Amplification curve of HBV DNA standard sample

2.2 感染细胞的上清液中 HBsAg、HBeAg 化学发光微粒子免疫检测 感染后初代各时间点细胞的上清液中 HBsAg 量随时间延长而增加,见图 5;传代

细胞 1~3 代上清液可检测到 HBsAg, HBsAg 量随代数增加而降低,第 4 代以后阴性。初代及传代细胞的上清液中, HBeAg 均为阴性。见图 6。

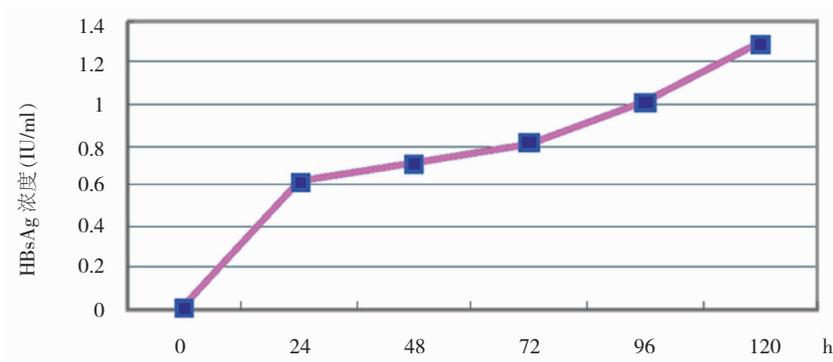


图 5 感染后初代细胞各时间点上清液中 HBsAg 浓度

Figure 5 Supernatant HBsAg concentration of the first passage of infected cells at different time points

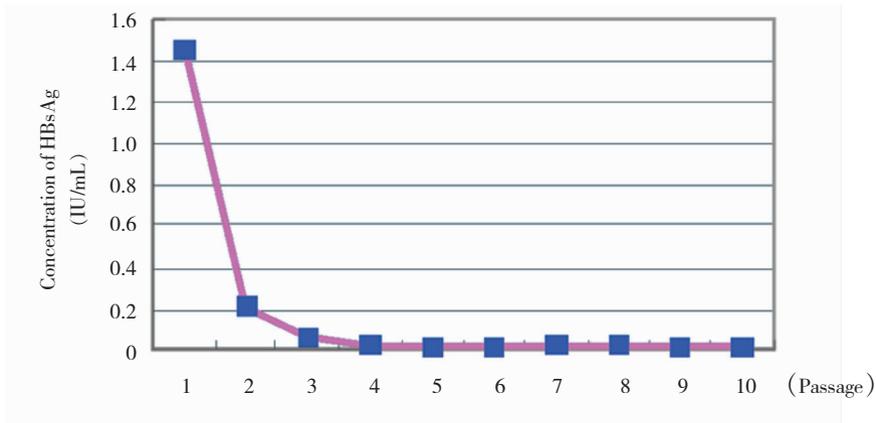
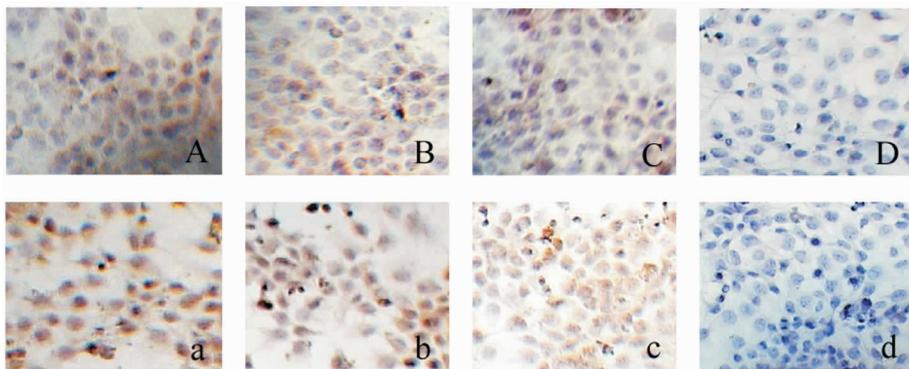


图 6 感染后各代细胞上清液中 HBsAg 浓度

Figure 6 Supernatant HBsAg concentration in infected cells at each passage culture

2.3 感染后各代细胞中 HBsAg、HBcAg 的表达 采用 SABC 免疫组化方法检测 1~4 代感染细胞爬片。在 1~3 代细胞 HBsAg 染色,阳性细胞可见胞

浆染成弥漫性棕黄色;1~3 代感染的细胞 HBcAg 染色,阳性细胞核均可见染成棕红色。阴性对照二者染色均阴性。见图 7。



A—C; HBsAg staining in the first—third passages of infected cells; a—c; HBcAg staining in the first—third passages of infected cells; D and d; Negative control

图 7 感染后各代细胞中 HBsAg、HBcAg 的表达

Figure 7 HBsAg and HBcAg expression in infected cells of each passage culture

3 讨论

慢性乙型肝炎是我国发病率高、危害严重的传染病之一,若得不到正确治疗,最终的结果均将发展为肝硬化和肝细胞癌^[2-3]。母婴传播是 HBV 传播的主要途径^[4],是 HBV 慢性感染的重要原因,而宫内感染是 HBV 发生母婴传播的途径之一。HBV 宫内感染的机制复杂,其中胎盘屏障起到重要作用。滋养层细胞是胎盘屏障的第一层细胞,在妊娠过程中,胎盘滋养层细胞与母体血液直接接触,是 HBV 通过胎盘屏障的第一步,所以研究滋养层细胞的 HBV 感染对探讨 HBV 宫内感染机制很有意义^[5-7]。

BeWo 细胞株通常被用来进行胎盘屏障生理功能的研究^[8]。2007 年, Bhat 等^[9]首次用其模拟胎盘屏障进行鸭 HBV 穿越胎盘的研究。本研究采用该细胞株构建 HBV 体外直接感染胎盘细胞模型,以研究 HBV 宫内感染机制。

1988 年, Lucifora 等^[10]首先在 HBsAg 携带产妇胎盘中检测到 HBsAg 的存在。Gabrielli 等^[11]在 2001 年报道,体外培养滋养层细胞在离体状态下可以感染 HBV。我们的实验表明,HBV 体外感染滋养层细胞 BeWo 细胞株,感染后的细胞在上清液中释放的 HBsAg 浓度和 HBV DNA 量随着时间延长而呈正相关逐渐增加;细胞内的 HBV DNA 量亦呈增加趋势。提示 HBV 可以感染滋养层细胞,并在感染后的一定时间内病毒载量表达呈增加趋势。HBV 感染 BeWo 细胞 24 h 后,用 PBS 反复冲洗 8 次,检测 HBsAg 浓度和 HBV DNA 量均阴性,证实通过多次的冲洗,细胞表面附着的病毒已基本去除,而只有进入细胞内的 HBV 进行复制才能使 HBV DNA 量和所分泌的 HBsAg 随着时间的延长而增加。

HBV 感染的 BeWo 细胞传代,传代后细胞及上清液中的 HBV DNA 量随传代次数增加逐渐降低,第 5 代阴性;传代细胞的上清液 HBsAg 浓度逐渐降低,第 4 代阴性;传代细胞免疫组化染色第 1~3 代可见 HBsAg、HBcAg 表达;证实 HBV 能在传代细胞中表达,但表达并不持久。考虑可能 HBV

感染 BeWo 细胞不同于肝细胞,不能在细胞核内形成 cccDNA 使 HBV 持续地复制及表达。

因此,可用 BeWo 细胞进行 HBV 宫内感染机制的研究。我们将进一步应用 BeWo 细胞研究 HBV 发生宫内感染的时期和人乙型肝炎免疫球蛋白阻断 HBV 感染的实验,探讨 HBV 宫内感染阻断失败的原因。

[参 考 文 献]

- [1] Xu D Z, Yan Y P, Choi B C, *et al.* Risk factors and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus; a case-control study[J]. *Med Virol*, 2002, 67(1): 20-26.
- [2] Maddrey W C. Hepatitis B: an important public health issue [J]. *J Med Virol*, 2000, 61(3): 362-366.
- [3] Mast E E, Alter M J, Margolis H S. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infection: a global perspective [J]. *Vaccine*, 1999, 17(13-14): 1730-1733.
- [4] Michielsen P P, van Damme P. Viral hepatitis and pregnancy [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 1999, 62(1): 21-29.
- [5] Arechavaleta-Velasco F, Koi H, Strauss J F, *et al.* Viral infection of the trophoblast: time to take a serious look at its role in abnormal implantation and placentation? [J]. *Reprod Immunol*, 2002, 55(1): 113-121.
- [6] Lagaye S, Derrien M, Menu E, *et al.* European network for the study of in utero transmission of HIV-1 cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection[J]. *J Virol*, 2001, 75(10): 4780-4791.
- [7] Koi H, Zhang J, Parry S. The mechanisms of placental viral infection[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 943: 148-156.
- [8] Zhou F, Hong M, You G. Regulation of human organic anion transporter by progesterone and protein kinase C in human placental Bewo cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(1): 57-61.
- [9] Bhat P, Anderson D A. Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier[J]. *J Virol*, 2007, 81(13): 7200-7207.
- [10] Lucifora G, Calabro S, Carroccio G, *et al.* Immunocytochemical HBsAg evidence in placenta sofa symptomatic carrier mothers[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 159(4): 839-842.
- [11] Gabrielli L, Losi L, Varani S, *et al.* Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimester human placenta[J]. *J Med Virol*, 2001, 64(4): 499-504.