

SABC法和胶体金标免疫电镜观察 体外感染细胞中HCV-NS5的表达*

叶进¹, 曾令兰¹, 杨木兰², 罗端德¹, 郭劲松¹

(1. 同济医科大学协和医院传染科, 湖北武汉 430022;
2. 同济医科大学实验中心超微病理研究室, 湖北武汉 430030)

Observation of the Expression of HCV NS 5 Antigen *in vitro* by the SABC Immunological Techniques and Gold-labeled Colloid Electron Microscopy Method

YE Jin¹, ZENG Ling-lan¹, YANG Mu-lan², LUO Duan-de¹, GUO Jin-song¹

(1. Department of Infectious Disease, Xiehe Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022;
2. Lab of Ultra-micro Pathology of Experiment Center, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

Abstract: To study the expression of HCV non-structure 5 antigen *in vitro*, a human HepG2 cell line was incubated with a HCV RNA positive serum. The SABC immunological techniques and gold-labeled colloid electron microscopy method were employed to examine for the viral proteins in those cells. The HCV non-structure 5 antigen was first detected in the HepG2 cells at 72 hours post incubation. The antigen was continuously observed in the cytoplasm or on the membrane as well on the cell wall of the HepG2 cells even after 1, 2, 3 and 4 weeks post incubation. The observation of HCV non-structure 5 antigen continuously expressed in the HepG2 cells strongly indicates that the cells may have been infected by HCV virus and the virus may have replicated in the cells. Therefore, the HepG2 cell line may be served as a potential host for establishment of HCV infection and propagation *in vitro*.

Key Words: Hepatitis C virus; Infection; Antigen; Expression

关键词: 丙型肝炎病毒; 感染; 抗原; 表达

中图分类号: R512.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0088-04

寻找敏感的丙型肝炎病毒(HCV)体外培养系统,对于研究HCV的病毒体特征、致病机理、抗病毒治疗和疫苗研制等方面有着重要的意义。我们曾在体外感染的人T淋巴细胞中发现HCV的正、负链^[1],随后对于HCV在体外感染细胞中的抗原表达情况又做了进一步研究,现报道结果如下。

1 材料和方法

1.1 HCV RNA 阳性接种物

选择HCV RNA水平为 2×10^4 拷贝/mL(荧光定量法。试剂盒由美国Biotronics公司提供)的血清,该血清检查甲、乙、丁、戊型肝炎标志为阴性,以

收稿日期:1999-11-15,修回日期:2000-04-12

* 基金项目:国家教委留学回国人员基金资助项目(1995-806)

作者简介:叶进(1959-),女,湖北武汉籍,副教授,副主任医师,医学博士。

此作为接种物,同时,选用正常人的血清作阴性对照。

1.2 HCV 的细胞感染

人肝癌细胞株(HepG2 细胞株)作为感染靶细胞。由中国典型培养物保藏中心提供。将 HepG2 细胞培养至 1×10^5 /瓶,弃去上清,分别用 1 mL 的 HCV RNA 阳性或阴性血清感染细胞,置于 37℃ 二氧化碳孵箱中 2 h,加入细胞培养液 DMEM(不含小牛血清)过夜。次日弃去上清,用 $1 \times$ PBS 洗涤三次,再加入含 10% 小牛血清的 DMEM 继续孵化。于感染后的 72 h 和第 1、2、3、4 周收集细胞检测 HCV-NS5。

1.3 标本制备

将收集的细胞用 Hank's 液离心洗涤 2 次,然后用 DMEM 液将其制备成 0.5×10^6 /mL 的细胞悬液,取 20 μ L 滴片,晾干后用冰丙酮固定,置于 -20℃ 用于 SABC 免疫组化法检测。

1.4 SABC 法检测细胞中 HCV-NS5

鼠抗-NS5 由北京医科大学肝病研究所制备。SABC 实验盒系武汉博士德生物工程公司产品。对照试验:包括分别用正常鼠血清和 PBS 代替第 1 抗体、正常羊血清和 PBS 代替第 2 抗体试验;HCV RNA 阴性血清感染的细胞作为阴性对照。操作按说明书进行。

1.5 胶体金标免疫电镜检测细胞中的 HCV-NS5

将培养的 HepG2 细胞经 4% 多聚甲醛和 2.5% 的戊二醛混合液固定 1 h。用 0.05 mol/L TBS 洗涤 3 次,加入 1% 牛血清白蛋白(BSA)处理 30 min 后,加入 1:10 的鼠抗-NS5,置室温 30 min。0.02 mol/L TBS 洗涤 3 次,再经 1% BSA 处理 30 min,加入 1:20 羊抗鼠胶体金 5 nm(购于武汉博士德生物工程公司),置室温下 1 h。用 0.02 mol/L TBS(pH7.4)洗涤 10 min,再用 0.05 mol/L PBS 洗涤 3 次,送同济医科大学电镜室超薄切片后检查。对照试验:分别用 PBS 代替 I 抗、II 抗和用 HCV RNA 阴性血清感染的细胞作阴性对照。

2 结果

2.1 SABC 法检测 HCV-NS5 结果观察

细胞中 HCV-NS5 阳性呈棕黄色细小颗粒分布于细胞核、细胞浆内和细胞膜上,以浆型居多数(见图 1A)。阳性细胞呈弥漫分布。感染后 72 h,第 1、2、3 和 4 周 HepG2 细胞均呈阳性。

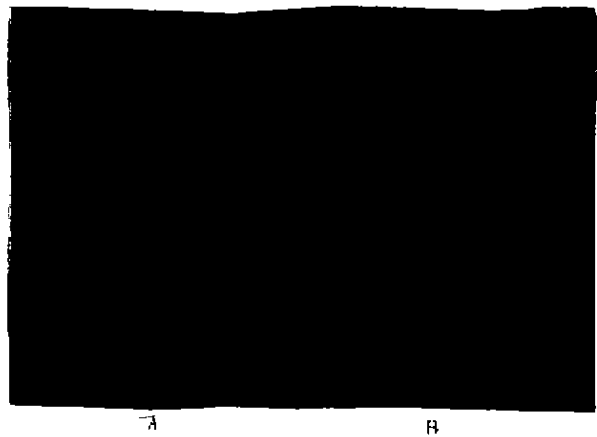


图 1 HCV-NS5 的 SABC 检测

A, HCV-NS5 阳性信号位于感染后第二周的 HepG2 细胞浆内和细胞膜上($\times 200$);B, 在对照试验中,未发现 HCV-NS5 的阳性信号($\times 200$)。

Fig. 1 Examination of HCV-NS5 by SABC

A, The positive signals of HCV-NS5 on the cytoplasm and membrane of HepG2 on two weeks post infection ($\times 200$);B, The positive signals of HCV NS5 were not shown in the blank test ($\times 200$).

2.2 胶体金标免疫电镜检测 HCV-NS5 结果观察

经胶体金免疫电镜观察,细胞浆内有电子密度大的金标颗粒的吸附(见图 2A)。细胞核或胞膜上也有金标颗粒的吸附(见图 2B)。感染后 72 h,第 1、2、3 和 4 周的细胞均呈阳性。同时在电镜下观察,被感染的细胞超微结构完整,胞质较均匀,偶尔可见到空泡,未见明显的溶解坏死和核固缩,也未发现病毒颗粒。

2.3 对照试验

在 SABC 法和胶体金标免疫电镜法对照试验的细胞中,未发现 HCV-NS5 的阳性信号出现(见图 1B 和 2C)。

3 讨论

HCV 为单股正链 RNA 病毒,在感染者的血清和肝组织内数量较少,因此很难在电镜下看到病毒颗粒。由于缺乏合适的 HCV 感染的细胞和动物模型,使得 HCV 的研究进展受到明显的限制^[2]。寻找敏感的 HCV 体外培养系统,对于 HCV 的研究有着重要的意义。近年来,先后有众多关于建立 HCV 体外感染细胞模型的报道^[3-5],无论 HCV 核酸和蛋白在这些细胞中复制和表达的时间长短以及量的多少,这对于进一步了解 HCV 的生命周期研究都有着重要的意义。



图2 HCV-NS5的胶体金标免疫电镜观察

A. 感染后72小时的HepG2细胞浆内吸附电子密度大的金标颗粒($\times 10\ 000$); B. 感染后第二周的HepG2的细胞核内见金标颗粒($\times 12\ 500$); C. 在胶体金标免疫电镜法对照试验中,未发现金标颗粒($\times 4\ 000$)。

Fig. 2 Examination of HCV-NS5 by gold-labeled colloid electron microscopy

A. The adsorption of gold-labeled granules with a high electron density in the cytoplasm of HepG2 at 72 hours post infection ($\times 10\ 000$); B. The gold-labeled granules in the nucleus of HepG2 on two weeks post infection ($\times 12\ 500$); C. The gold-labeled granules were not shown in blank control test ($\times 4\ 000$).

目前已报道的HCV体外感染细胞模型包括两大类,即转基因细胞模型和血清感染模型^[6,7]。前者虽有转染率高优点,但由于受到实验条件的限制,很难在众多的实验室开展研究。而后者则具备直接、简单、快速、易重复等优点,是一种经济实用,能在众多实验室开展的一种研究方法。我们用HCV RNA阳性血清在体外感染HepG2细胞株,从感染后的72 h开始,在被感染的细胞核、胞浆内和胞膜上发现了HCV-NS5表达的阳性信号,直到感染后的第四周。本实验结果表明,HCV在感染的HepG2细胞中能表达NS5抗原,HepG2细胞株能够作为体外HCV感染和培养的宿主。

目前认为HCV主要在被感染的肝细胞浆中进行核酸复制和蛋白表达^[8-10]。像黄病毒和瘟病毒一样,HCV复制被认为是在限定的细胞质内^[11]。本次实验结果显示,两种方法检测到的HCV-NS5阳性信号均主要易见于细胞浆中,证实了HCV蛋白的表达主要在被感染的细胞浆内进行。同时,我们发现在被感染细胞的膜上,也有NS5抗原的阳性信号,提示HCV可能首先在细胞浆中经宿主和病毒蛋白酶作用下,加工合成非结构蛋白的NS5,然后借助宿主内膜转移系统将表达的蛋白运输到宿主细胞膜上。因此,NS5抗原在细胞膜上的发现,对于

研究NS5抗原是否为HCV感染的免疫应答的靶抗原有着重要的意义。

丙型病毒性肝炎的致病机理有两种可能,一种是直接导致细胞病变,另一种是免疫介导的肝细胞损伤。有研究表明,在门管区有淋巴细胞聚集现象,并从中发现大量的CD4⁺和CD8⁺细胞^[12],这些都提示丙型病毒性肝炎致病机理中存在免疫介导的肝细胞损伤。我们在电镜下观察,发现感染的HepG2细胞超微结构完整,胞质较均匀,偶见空泡,未见明显的变性、坏死。说明在丙型病毒性肝炎的致病机理中,病毒直接损伤导致肝细胞病变不是主要的原因,免疫介导的损伤可能是肝脏病变的主要原因。

经过多年的研究,尽管HCV在体外感染的细胞模型中能够复制核酸和表达抗原蛋白,但在培养的细胞中表达和分离出完整的、真正的病毒颗粒,在研究方法和实验技术上还有待于进一步完善提高,还必须寻找更敏感的体外培养系统和动物模型,使我们有可能像分离和提纯乙型肝炎病毒(HBV)那样,得到纯化的HCV病毒颗粒,将它广泛地应用到丙型病毒性肝炎的研究中,从而尽早弄清丙型病毒性肝炎的发病机制,寻找有效的抗病毒药物,早日研究出HCV的疫苗。

参考文献

- [1] 叶进, T Goeser. 丙型肝炎病毒在人 T 淋巴细胞中的体外感染[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(1): 41-43.
- [2] 王小红. 抗丙型肝炎病毒药物评价模型研究进展[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 1997, 24(4): 156-159.
- [3] Lanford R F, Surcia C, Jacobs JR, *et al.* Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT-PCR [J]. *Virology*, 1994; 202: 606-614.
- [4] Tsuboi S, Nagamon S, Miyazaki M, *et al.* Persistence of Hepatitis C virus RNA in established human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *J Med Virol*, 1996; 48: 133-140.
- [5] Hiramatsu N, Dash S, Gerber A. HCV cDNA transfection to HepG2 cells [J]. *J Viral Hepat*, 1997, (suppl 1): 61-67.
- [6] 房静远, Onwang E, Wu C H, *et al.* 丙型肝炎病毒 NS5B 在 Huh-7 细胞中的转录与表达. 中华肝病杂志 2000, 8: 33-34.
- [7] 宋去强, 郝非. 人肝癌细胞系 7721 丙型肝炎病毒体外感染模型的建立[J]. 中华传染病杂志, 1999, 17(4): 224-227.
- [8] Negro F, Pacchoni D, Shimizu Y, *et al.* Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 2247-2251.
- [9] Blight K, Lesniewski RR, Labrooy JT, *et al.* Detection and distribution of hepatitis C-specific Antigens in naturally infected liver [J]. *Hepatology*, 1994, 22(3): 553-557.
- [10] Sansonno D, Dammaco F. Hepatitis C virus c100 antigen in Liver tissue from patients with acute and chronic infection [J]. *Hepatology*, 1993, 18(2): 240-245.
- [11] 单梅梅. 丙型肝炎病毒体外复制和表达的若干研究进展[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 1997, 24(3): 97-102.
- [12] Mosnier JF, Degott C, Morcellin P, *et al.* The straportal lymphoid nodule and its environment in chronic active hepatitis C: an immunohistochemical study [J]. *Hepatology*, 1993; 17(3): 366-371.